

I. Introduction

En génétique médical, notre but est de faire un diagnostic pré-natal de maladies. Pour faire cette analyse, on va étudier les acides nucléiques.

- **ADN dans 95% des cas** / ARN → rare car très instable
- Les échantillons sont de **très faible quantité** (quelques microgrammes) et toujours à partir de **cellules nucléées** ++++
 - o Donc **jamais à partir de GR**

II. Principales techniques d'analyse moléculaire

A. Extraction de l'ADN et de l'ARN

ADN	1) Prélèvement de sang sous EDTA (Anticoagulant) - <u>Jamais avec de l'héparine</u> +++ 2) Lyse des GR avec une solution Hypotonique - Car ici ce sont les GB qui nous intéresse ++ 3) Récupération des GB dans une solution de protéinase K - Ici le but est de détruire les protéines entourant l'ADN 4) Extraction au phénol-chloroforme 5) Précipitation de l'ADN par l'éthanol à froid
ARN	Il est beaucoup plus difficile à étudier car très instable ++ - Instable veut dire qu'il est très sensible aux RNases L'ARN est très peu utilisé en diagnostic de routine mais plutôt pour étudier l'expression d'un gène +++

B. Amplification par PCR.

Une fois notre ADN en petite quantité obtenue, on va l'amplifier pour obtenir en grande quantité.

Cette amplification est **spécifique**, **très sensible** et possède un fort risque de **contamination** +++

- C'est pour cela que les étapes se déroulent dans **un circuit monodirectionnel**

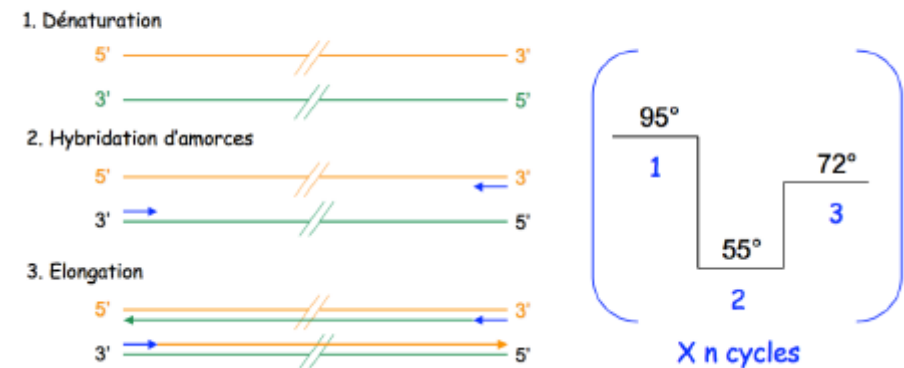
Prérequis : ADN du patient, Amorce, dNTP, tampon $MgCl_2$, Taq Polymérase

- La **Taq Polymérase** est une ADN polymérase **d'origine bactérienne** et **résistante à la chaleur**.
- Il est nécessaire de connaître également les **bornes d'amont et d'aval** de la région à étudier (**18-20 nucléotides**)

Déroulement de l'amplification : cycle de 3 étapes se déroulant aussi longtemps que nécessaire.

- Au bout de n cycles, on aura 2^n ADN

DENATURATION → HYBRIDATION → ELONGATION ♥



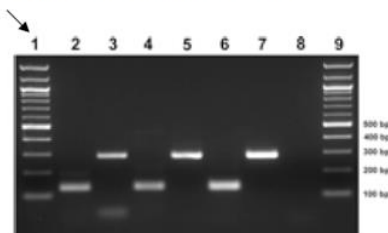
C. Electrophorèse sur gel.

Une fois notre PCR effectuée, on va s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination.

Déroulement :

- Séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille sur gel d'agarose ou d'acrylamide
- La migration s'effectue **du – vers +**
- Une fois la migration terminée, on effectue une **coloration au bromure d'éthidium (BET)** que l'on visualisera **sous lumière UV**.

Marqueur de poids moléculaire



III. Recherche d'une mutation ciblée.

A. Cas de l'Achondroplasie.

- C'est la plus fréquente des chondroplasies (1/15 000)
- Le diagnostic est évoquée par **signe d'appel échographique = « fémurs courts »**
- C'est une maladie de **transmission autosomique dominante**
- **90% des cas → mutation de novo**
- Forme **plus grave → atteinte chez un homozygote** pour la mutation

Caractéristiques :

- Petite taille
- Membres courts
- Hyperlordose
- Mains courtes
- Macrocéphalie
- Front haut
- Ensellure nasale marquée
- **Intelligence normale ++**
- Complications neurologiques (myélopathie)



Gène responsable : FGFR3 → code pour un **récepteur de croissance fibroblastique** et va causer dans la maladie une anomalie de formation du cartilage.

- La mutation sera **toujours située au même endroit**

Comment dépister une achondroplasie devant un signe d'appel échographique ?

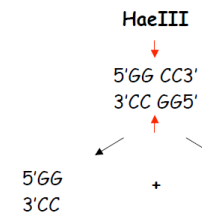
- 1. Extraction de l'ADN
- 2. Amplification par PCR
- 3. Vérification par électrophorèse
- 4. Digestion enzymatique

D. Digestion enzymatique.

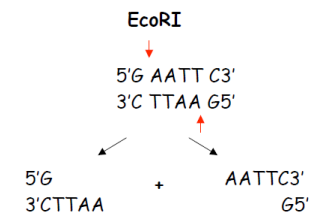
Pour la digestion enzymatique, on utilise :

- **Enzymes de restrictions de type II = ENDOnucléase bactérienne**
 - Cette enzyme provoque la **coupure spécifique** et **reproductible** de l'ADN double brin
 - L'enzyme reconnaît une séquence dite « **palindromique** » (*cad qui se lit dans les 2 sens comme le mot « KAYAK » ou « ANNA »*).
 - La digestion (ou coupure) peut être à **bout franc** ou **cohésif**

Coupures à bouts francs
(blunt ends)



Coupures à bouts cohésifs
(sticky ends)



IV. Séquençage de l'ADN.

Le but du séquençage de l'ADN est de déterminer la succession de nucléotides composant l'ADN afin de vérifier un diagnostic.

La méthode de référence → Méthode de Sanger

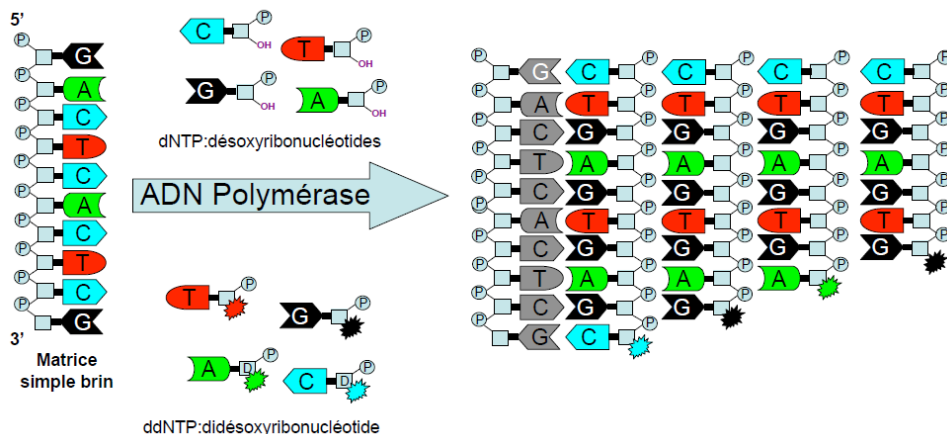
Déroulement : Des cycles successifs de **3 étapes** vont se succéder (**dénaturation, hybridation, élongation**).

A chaque cycle, on va incorporer au hasard un dNTP ou un ddNTP

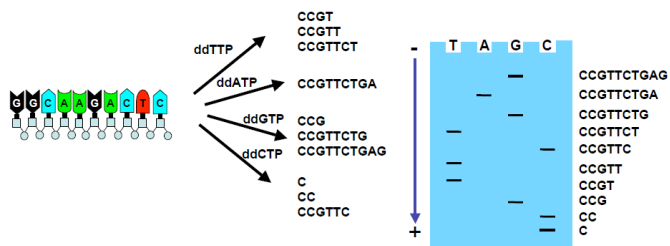
- dNTP = nucléotide simple possédant une base, un désoxyribose et 3 phosphates
- un **ddNTP** va lui, en s'incorporant, **arrêter la synthèse**.

Dans la méthode de référence, **chaque tube** va comprendre : **4 dNTPs** (A, T, G et C), un **ddNTP**, une **polymérase**, une **amorce** et un **fragment d'ADN**.

Dans la méthode automatisée, chaque ddNTP est couplé à un **fluochrome** de couleur différente, ainsi **dans un même tube, on peut y ajouter 4 ddNTPs** différents.



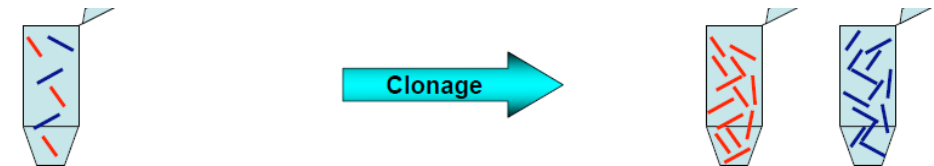
Ensuite, les produits synthétisés sont **séparés par électrophorèse**



V. Le Clonage Moléculaire.

Lorsque l'on possède des ADNs venant de différentes personnes, on ne peut pas faire de séquençage, ni d'amplification PCR, il est alors nécessaire de faire un clonage.

Clonage moléculaire : Le but est d'obtenir des copies identiques et absolument pures d'une séquence donnée d'ADN.



Déroulement : 4 étapes vont être nécessaires,

1. **Préparer l'ADN recombinant**
 - o ADN recombinant = vecteur + insert
2. **Introduire le vecteur dans la cellule hôte**
3. **Sélectionner, isoler et amplifier les clones bactériens**
4. **Obtention d'un ADN recombinant en plus grande quantité**



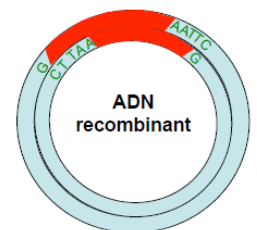
Qu'est-ce qu'un vecteur ?

C'est un **ADN circulaire double brin** se répliquant de **manière autonome**.

- Cet ADN est de taille réduite et va **permettre l'insertion d'un fragment d'ADN étranger**.

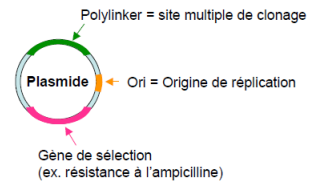
On en distingue 2 types :

Vecteur de clonage	Vecteur d'expression
Isoler physiquement un fragment d'ADN d'intérêt et amplifier le nombre de copies de cet ADN	Transférer un gène dans une cellule hôte eucaryote



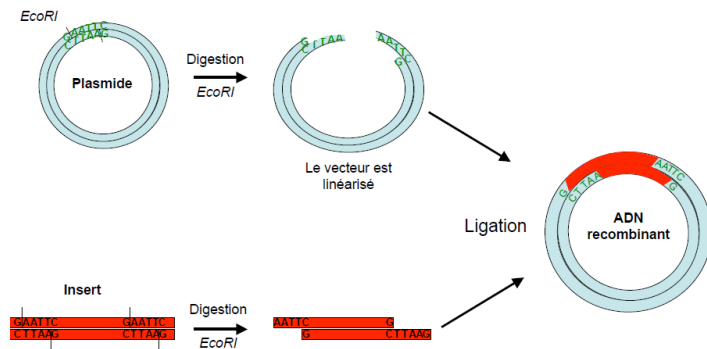
Qu'est-ce qu'un plasmide ? C'est le vecteur une fois qu'il a été recombiné

- **Polylinker** : stite multiple de clonage
- **Origine de réplcation** : permet au plasmide de se multiplier indépendamment de la bactérie
- **Gène de sélection** : gène de résistance à un ATB (Antibiotique)



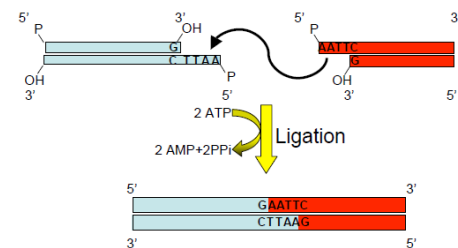
1. Préparation du vecteur et de l'insert.

- Digestion par des **enzymes de restriction**



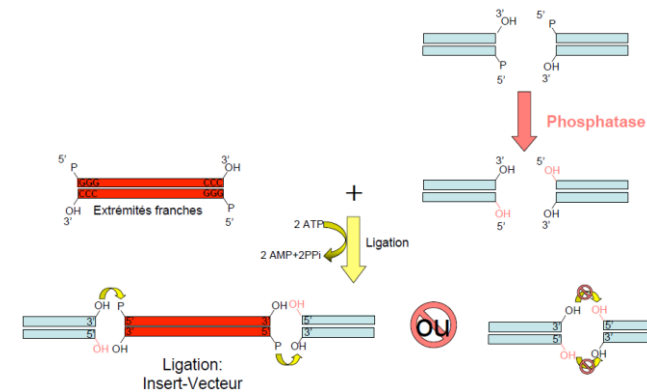
2. Ligation du vecteur et de l'insert

On va utiliser une enzyme formant une liaison phosphodiester = **T4 DNA ligase**.



Problème : la ligase peut refermer le vecteur **avec ou sans insert**.

- Solution : une **étape de déphosphorylation va être nécessaire** via l'utilisation d'une phosphatase qui va générer des extrémités franches.

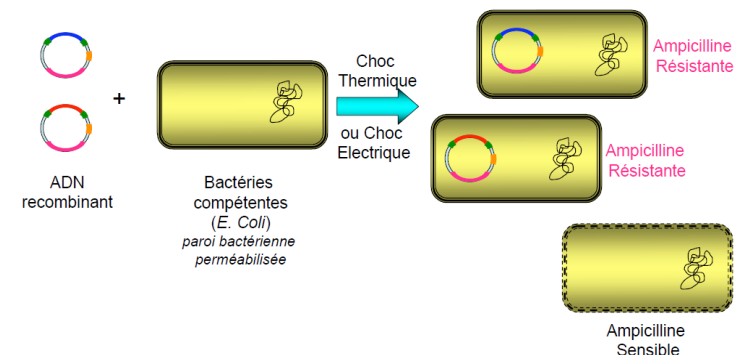


B. Introduction du vecteur dans la bactérie hôte.

1. Transformation bactérienne.

Pour que le plasmide rentre dans la bactérie, il va falloir **perméabiliser la membrane** via un **choc thermique**, **électrique** ou **chimique**.

- Au final chaque bactérie possèdera 1 ADN recombinant
 - Mais **Attention ! Il est possible de trouver des bactéries ne possédant pas d'ADN recombinant.**



C. Sélection et amplification des clones bactériens.

Dans une boîte de pétri contenant de la **gélose** et un **antibiotique**, on va étaler les bactéries.

- Grâce à l'antibiotique, on va pouvoir séparer les bactéries ayant intégré l'ADN recombinant des autres. *Pourquoi ?*

Parce que sur l'ADN recombinant, on trouve un gène de résistance aux antibiotiques.

- Ainsi les bactéries ayant intégrés l'insert vont survivre.

Problème : il n'y a **jamais 100% des vecteurs qui auront intégrés l'insert**

- **Solution** : **Sélection blanc / bleu.**

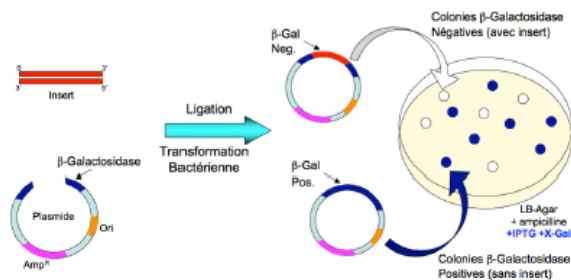
1. La Sélection blanc/bleu.

Lorsque l'insert est présent, il s'insère pile au niveau d'un gène codant pour la bêta-galactosidase.

- Le gène codant pour la galactosidase va colorer la bactérie en bleu

Ainsi quand l'insert est présent, il empêche l'expression de la B-galactosidase et la bactérie reste blanche.

AVEC INSERT	SANS INSERT
Gène β -Galactosidase inactivé	Gène β -Galactosidase fonctionnel
X-Gal incolore non hydrolysé	X-Gal hydrolysé colorant le milieu en bleu
COLONIES BLANCHES	COLONIES BLEUES



D. Amplification des clones bactériens.

Chaque colonie va être mise en culture dans un milieu de culture adapté à la croissance bactérienne, toujours en présence d'antibiotique.

- Une fois la croissance terminée, on récupère l'ADN et on le séquence.

